

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

---

Année 1932

THÈSE

342  
N°

POUR

LE DOCTORAT EN MÉDECINE  
(DIPLOME D'ÉTAT)

PRÉSENTÉE PAR

**JEAN TIFFENEAU**

DIPLOMÉ DE L'INSTITUT D'HYGIÈNE DE PARIS

*Né le 13 Janvier 1907, à Paris.*

---

SUR UNE BACTÉRIACÉE TRANSFORMANT  
LA GLYCÉRINE EN

**ALDÉHYDE L-GLYCÉRIQUE**

---

*Président : M. DESGREZ, Professeur.*

---

PARIS

A. MARETHEUX ET L. PACTAT, IMPRIMEURS

1, RUE CASSETTE, 1

—  
1932



FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

---

Année 1932

# THÈSE

N°

---

POUR

LE DOCTORAT EN MÉDECINE  
(DIPLOME D'ÉTAT)

PRÉSENTÉE PAR

**JEAN TIFFENEAU**

DIPLOMÉ DE L'INSTITUT D'HYGIÈNE DE PARIS

*Né le 13 Janvier 1907, à Paris.*

---

SUR UNE BACTÉRIACÉE TRANSFORMANT  
LA GLYCÉRINE EN

# ALDÉHYDE L-GLYCÉRIQUE

---

*Président : M. DESGREZ, Professeur.*

---

PARIS

A. MARETHEUX ET L. PACTAT, IMPRIMEURS

1, RUE CASSETTE, 1

---

1932

# FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

**Le Doyen.** . . . . .

**M. BALTHAZARD.**

## I. — Professeurs.

Anatomie . . . . .  
Anatomie médico-chirurgicale et chirurgie expérimentale. . . . .  
Physiologie . . . . .  
Physique médicale. . . . .  
Chimie médicale. . . . .  
Bactériologie. . . . .  
Parasitologie et histoire naturelle médicale . . . . .  
Pathologie et thérapeutique générales . . . . .  
Pathologie médicale . . . . .  
Pathologie chirurgicale. . . . .  
Anatomie pathologique. . . . .  
Histologie . . . . .  
Pharmacologie et matière médicale . . . . .  
Thérapeutique . . . . .  
Hygiène et médecine préventive . . . . .  
Médecine légale . . . . .  
Histoire de la médecine et de la chirurgie . . . . .  
Pathologie expérimentale et comparée. . . . .  
Hydrologie thérapeutique et climatologie . . . . .

**MM.**  
**ROUVIERE.**  
**GREGOIRE.**  
**BINET.**  
**STROHL.**  
**DESGREZ.**  
**N...**  
**BRUMPT.**  
**BAUDOUIN.**  
**CLERC.**  
**N...**  
**ROUSSY.**  
**CHAMPY.**  
**TIFFENEAU.**  
**LOEPER.**  
**TANON.**  
**BALTHAZARD.**  
**LAIGNEL-LAVASTINE.**  
**FIESSINGER.**  
**MAURICE VILLARET.**

Clinique médicale . . . . .

**CARNOT.**  
**BEZANÇON.**  
**ACHARD.**

Hygiène et clinique de la première enfance . . . . .  
Clinique des maladies des enfants . . . . .  
Clinique des maladies mentales et des maladies de l'encéphale. . . . .  
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques . . . . .  
Clinique des maladies du système nerveux. . . . .  
Clinique des maladies infectieuses . . . . .

**MARCEL LABBÉ.**  
**LEREBOULLET.**  
**NOBECOURT.**  
**H. CLAUDE.**  
**GOUGEROT.**  
**GUILLAIN.**  
**LEMIERRE.**  
**LENORMANT.**

Clinique chirurgicale . . . . .

**CUNEO.**  
**LEJARS.**  
**GOSSET.**

Clinique ophtalmologique. . . . .

**TERRIEN.**

Clinique urologique . . . . .

**LEGUEU.**  
**COUVELAIRE.**

Clinique d'accouchements. . . . .

**BRINDEAU.**  
**JEANNIN.**

Clinique gynécologique. . . . .

**J.-L. FAURE.**  
**OMBREDANNE.**

Clinique chirurgicale infantile et orthopédie . . . . .

Clinique thérapeutique médicale . . . . .

**RATHERY.**  
**LEMAITRE.**

Clinique oto-rhino-laryngologique. . . . .

Clinique thérapeutique chirurgicale . . . . .

**PIERRE DUVAL.**  
**SERGEANT.**

Clinique propédeutique. . . . .

**LÉON BERNARD.**  
**MAUCLAIRE.**

Clinique de la tuberculose . . . . .

**MULON.**

Professeurs sans chaires . . . . .

## II. — Agrégés en exercice.

**MM.**  
**ALAJOUANINE.**  
**AUBERTIN.**  
**BENARD HENRI.**  
**BROCC.**  
**BRULE.**  
**BUSQUET.**  
**CADENAT.**  
**CATHALA.**  
**CHABROL.**  
**CHAILLEY-BERT.**  
**CHEVALLIER.**  
**DOGNON.**  
**DONZELOT.**

**MM.**  
**ÉCALLE.**  
**FEY.**  
**GASTINEL.**  
**GATELLIER.**  
**GAUDART-D'AL-**  
**LAINES (de).**  
**GIROUD.**  
**HALPHEN.**  
**HARVIER.**  
**HAZARD.**  
**HOVELACQUE.**  
**HUGUENIN.**  
**HUTINEL.**

**MM.**  
**JOANNON.**  
**LABBÉ HENRI.**  
**LAROCHE GUY.**  
**LEVEUF.**  
**LEVY-VALENSI.**  
**LIAN.**  
**MONDOR.**  
**MOREAU.**  
**MOULONGUET.**  
**MOURE.**  
**OBERLING.**  
**OLIVIER.**  
**PIEDELIEVRE.**

**MM.**  
**PORTES.**  
**QUENU.**  
**RICHT Fils.**  
**SANNIÉ.**  
**SÉZARY.**  
**TROISIER.**  
**VALLERY-RADOT**  
**(Pasteur).**  
**VAUDESCAL.**  
**VELTER.**  
**VERNE.**  
**VIGNES.**



Par délibération en date du 9 décembre 1798, l'École a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

A MON PÈRE

LE PROFESSEUR M. TIFFENEAU

PROFESSEUR DE PHARMACOLOGIE ET DE MATIÈRE MÉDICALE

PHARMACIEN DE L'HOTEL-DIEU

MEMBRE DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE

A MON PRÉSIDENT DE THÈSE

M. LE PROFESSEUR A. DESGREZ

PROFESSEUR DE CHIMIE MÉDICALE  
MEMBRE DE L'INSTITUT ET DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE

*En témoignage de ma vive reconnaissance et de mon respectueux attachement.*

A MES MAITRES DANS LES HOPITAUX

MONSIEUR LE PROFESSEUR RATHERY

MM. LES DOCTEURS HALBRON ET LÉVY-SOLAL

*En témoignage de ma profonde  
gratitude pour leur précieux ensei-  
gnement.*



Digitized by the Internet Archive  
in 2026

# SUR UNE BACTÉRIACÉE TRANSFORMANT LA GLYCÉRINE

EN

## ALDÉHYDE L-GLYCÉRIQUE

---

### INTRODUCTION

---

Au cours de recherches que j'ai effectuées sur des milieux synthétiques destinés à la culture du bacille tuberculeux, j'ai eu l'occasion, probablement par suite d'une contamination fortuite, d'isoler un bacille présentant la particularité de se développer très rapidement sur les milieux synthétiques glycélinés et de communiquer à ces milieux, dès les premiers jours, des propriétés réductrices vis-à-vis de la solution cupropotassique.

J'ai consacré une grande partie du présent travail à l'étude de ces propriétés cuproréductrices, non seulement en ce qui concerne leurs variations au fur et à mesure des progrès de la culture, mais aussi en ce qui concerne leur cause que je crois pouvoir attribuer à l'aldéhyde l-glycérique, premier stade de l'oxydation de la glycérine.

A l'occasion de cette étude, je me suis en outre attaché à examiner les variations simultanées de l'acidité du milieu et de l'ammoniaque et j'ai pu confirmer à cet égard les observa-

tions faites par divers auteurs avec de très nombreuses bactéries.

Ce travail comprendra trois parties. Dans la première, j'exposerai les conditions d'isolement du bacille que j'ai étudié avec la description de ses principaux caractères. La deuxième partie sera consacrée à l'exposé de mes recherches concernant la nature de la substance cuproréductrice. Enfin, dans la troisième partie, j'étudierai parallèlement les variations qui se produisent aux diverses périodes de la culture non seulement en ce qui concerne les propriétés cuproréductrices et le pouvoir rotatoire, mais aussi vis-à-vis de l'acidité et du pH du milieu et de sa teneur en ammoniacale.

---

## CHAPITRE PREMIER

### ISOLEMENT ET CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES ET FONCTIONNELS D'UN BACILLE DU TYPE PROTEUS

---

Les milieux glycérinés sur lesquels j'ai isolé occasionnellement un bacille producteur d'aldéhyde l-glycérique aux dépens de la glycérine étaient constitués par des milieux synthétiques ne comprenant à côté des sels minéraux habituels que de la glycérine comme source de carbone et un sel ammoniacal (sulfate ou citrate) comme source d'azote. J'ai notamment eu recours le plus souvent à un milieu dont la composition est la suivante :

|                                              |                         |
|----------------------------------------------|-------------------------|
| Sulfate (ou citrate) d'ammonium. . . . .     | 2 gr.                   |
| Sulfate de magnésium cristallisé. . . . .    | 2 gr.                   |
| Phosphate dipotassique cristallisé . . . . . | 2 gr.                   |
| Phosphate disodique cristallisé . . . . .    | 1 gr.                   |
| Acide citrique . . . . .                     | 2 gr.                   |
| Glycérine . . . . .                          | 20 gr.                  |
| Eau q. s. pour . . . . .                     | 1.000 cm <sup>3</sup> . |

Un de ces liquides s'étant trouvé trop acide, l'ensemencement effectué sur une dizaine de matras avec le bacille bovin dont je faisais alors l'étude ne fut pas suivi de culture, même après vingt jours d'étuve à 37°. Pour ajuster ce milieu à un taux d'acidité moins élevé, je me décidai à introduire dans chaque ballon, avec les précautions habituelles d'asepsie, 5 cm<sup>3</sup> d'une solution de soude normale que je supposais stérile. Les

dix matras furent remis à l'étuve et quelques jours après deux seulement se trouvèrent remplis d'un voile abondant.

Je fus frappé par la rapidité avec laquelle s'était développée cette culture, et qui contrastait avec la lenteur relative du développement du bacille tuberculeux. Comme je ne supposais pas alors une contamination étrangère par la soude, je pensais qu'il s'agissait d'un bacille atténué par le contact d'une solution acide; j'en poursuivis l'étude. Je constatai tout d'abord que le milieu dans lequel ce bacille avait cultivé présentait un caractère qu'aucun auteur n'avait encore signalé jusque-là pour le bacille tuberculeux, à savoir des propriétés cuproréductrices à froid et un pouvoir rotatoire lévogyre.

Je fus ainsi amené à entreprendre systématiquement l'étude de ce bacille en ce qui concerne les variations chimiques (acidité, ammoniacque, pouvoir cuproréducteur) qu'il est susceptible de produire dans les milieux glycélinés synthétiques dans lesquels il est cultivé et surtout de chercher à déterminer la nature de la substance cuproréductrice que je ne tardais pas à identifier à l'aldéhyde l-glycérique. Je m'aperçus alors que des substances cuproréductrices identiques ou analogues avaient déjà été signalées par quelques auteurs pour divers autres bacilles ou moisissures. Toutefois, les différences que présentait le bacille étudié par moi et le bacille tuberculeux étudié à ce point de vue par RENFREW (12), (18), (19), me fit douter de sa nature et, grâce à l'examen qui en fut très aimablement fait par le D<sup>r</sup> André PHILIBERT, il devint évident que j'avais affaire à un bacille du type *Proteus* et que celui-ci provenait d'une contamination dont la soude employée par moi était vraisemblablement la cause.

J'exposerai, dans ce premier chapitre, les principaux caractères du bacille que j'ai ainsi étudié et j'insisterai sur la fixité de ses caractères en ce qui concerne son influence sur les variations de composition du milieu au cours du développement.

1<sup>o</sup> *Caractères morphologiques.* — Ce bacille se présente en bâtonnets assez fins, d'une longueur d'environ 5 à 6  $\mu$ , mobiles à l'état frais et se disposant souvent en filaments notamment

dans les régions où il y a dissociation du voile. Il ne fournit pas de spores; il présente un Gram négatif et il n'est ni acido- ni alcool-résistant.

A la température de la chambre, aussi bien sur gélatine que sur bouillon, il ne se développe pas, après quatre jours; mais il finit plus tard par pousser faiblement et, de plus, les repiquages cultivent alors rapidement (48 heures).

A l'étuve à 37° il pousse bien sur gélose et sur bouillon peptoné; sur gélose, il donne une culture sèche, d'aspect blanchâtre; sur bouillon peptoné, il donne un voile mince blanc grisâtre qui se développe en surface puis se casse et tombe au fond du tube; peu à peu le milieu se trouble.

Sur gélose, après ensemencement dans le liquide de condensation, ce bacille envahit peu à peu toute la surface de bas en haut. Il coagule le lait et le digère, mais ne fait pas fermenter le lactose.

En définitive il semble bien qu'on se trouve en présence d'un *Proteus* très modifié, qui ne reprend que peu à peu ses caractères normaux.

2° *Caractères fonctionnels.* — Les deux principaux caractères fonctionnels que j'ai plus spécialement notés consistent, d'une part, comme je l'ai dit, en la rapidité du développement qui, suivant les cas et surtout d'après la composition du milieu, peut se produire après vingt-quatre ou quarante-huit heures; d'autre part, dans l'apparition du pouvoir réducteur qui est déjà nettement perceptible après quarante-huit heures et qui augmente ensuite progressivement jusque vers le sixième jour ou encore plus tardivement (<sup>1</sup>) pour diminuer ensuite.

Pour les divers ensemencements successivement effectués, je me suis contenté de prélever avec une anse de platine une portion de voile d'une culture récente et même parfois d'une culture plus ancienne; les résultats ont toujours été sensiblement

1. Les diverses cultures que j'ai faites ont présenté à cet égard des variations assez notables; cela tient probablement comme je l'ai exposé dans les lignes suivantes à ce que ces cultures ont été faites par des réensemencements successifs.

les mêmes au point de vue qualitatif mais avec certaines différences quantitatives. Les milieux synthétiques employés ne différaient entre eux que par la nature du sel ammoniacal utilisé, à savoir tantôt le sulfate, tantôt le citrate. Ce n'est que dans quelques essais spéciaux que le sel ammoniacal a été remplacé par de l'asparagine en vue de comparer les variations progressives de l'acidité, du pH et de l'ammoniaque.

Dans tous les cas, la culture a été rapide et, après vingt-quatre heures ou quarante-huit heures, toute la surface était recouverte d'un voile homogène dont l'épaisseur allait peu à peu en augmentant, sans cependant devenir granuleux comme pour les cultures normales de bacille bovin sur milieux peptonés ou synthétiques. Après deux ou trois semaines environ, la culture semble s'arrêter; le voile, qui déjà dès la deuxième semaine tendait à s'immerger, tombe peu à peu au fond des récipients. Nous verrons plus loin que cet arrêt de la culture se traduit par des variations du pH ainsi que du taux de l'acidité et de l'ammoniaque. Cet arrêt de la culture, qui coïncide avec un arrêt des transformations chimiques, semble dû en grande partie à l'augmentation de l'acidité, car, dans un cas où celle-ci avait été saturée en partie par addition de soude normale, le réensemencement a été suivi d'une nouvelle culture avec voile se formant, il est vrai, un peu plus lentement.

Une autre particularité présentée par les cultures de ce bacille consiste dans leur odeur. Tandis que les cultures normales de bacille tuberculeux présentent une odeur assez agréable et très caractéristique, les cultures que j'ai obtenues ont toujours présenté une odeur faiblement aigrelette qui se perçoit dès les premiers jours et qui, traversant les cotons, remplit peu à peu l'atmosphère de l'étuve où on la constate dès qu'on en ouvre la porte.

Dans les chapitres suivants, j'étudierai plus longuement les différences de composition chimique que présentent, au point de vue de l'acidité, de l'ammoniaque et du pouvoir cuproréducteur, les milieux ensemencés avec le bacille que j'ai étudié.

En ce qui concerne les taux de l'acidité et de l'ammoniaque,

je montrerai que, dès le début et jusque vers la troisième semaine, ceux-ci progressant en sens contraire, il y a augmentation de l'acidité et diminution de l'ammoniaque, alors que pour le bacille tuberculeux, d'après RENFREW (17), c'est seulement vers la deuxième ou la troisième semaine qu'on observe, comme dans nos essais, la marche inverse (augmentation de l'acidité et diminution de l'ammoniaque); il est vrai que cette particularité tient dans ce cas, non à la nature du bacille, mais à la présence d'asparagine; j'ai pu observer des faits analogues dans les essais que j'ai effectués avec cet amide et qui seront rapportés dans le chapitre III.

Pour le pouvoir cuproréducteur, nous verrons, dans le chapitre suivant, les différences profondes observées entre mes milieux de culture et les cultures de divers bacilles tuberculeux étudiés par RENFREW. Dans les cas étudiés par moi, le pouvoir cuproréducteur, dû à un produit d'oxydation immédiat de la glycérine, l'aldéhyde glycérique, se produit dès les premiers jours de culture et va en croissant jusque vers la deuxième semaine, puis diminue peu à peu; dans le cas du bacille bovin normal, étudié par RENFREW, HARING et JOHNSON, le pouvoir cuproréducteur, qui est dû vraisemblablement à des sucres réducteurs de formation synthétique, ne commence que vers la troisième semaine et va ensuite en progressant peu à peu jusque vers la sixième ou la septième semaine.

Ainsi, aussi bien au point de vue morphologique que fonctionnel, le bacille que j'ai étudié ne présente, pour ainsi dire, aucun caractère commun avec le bacille tuberculeux et ses caractères propres rapportés plus haut sont suffisants pour l'envisager comme un bacille du type *Proteus*.

En tout cas, il y a lieu d'éliminer les microorganismes dont PÉRÉ (17), d'une part, et CHALLENGER (8), de l'autre, ont montré leurs aptitudes à produire l'aldéhyde l-glycérique aux dépens de la glycérine. Outre les différences morphologiques, j'ai, d'autre part, observé une différence fonctionnelle avec le *Tyrothrix tenuis* étudié par PÉRÉ. Tandis que ce dernier se développe sur la mannite et produit même de l'aldéhyde glycé-

rique aux dépens de celle-ci, le bacille étudié ici ne croît pas sur le milieu synthétique, dont j'ai donné plus haut la formule lorsque la glycérine y a été remplacée par la mannite.

J'ai pu cependant constater que sur les milieux glycélinés ou mannités préconisés par PÉRE et ne contenant que deux sels minéraux, le phosphate de K et le sulfate ammoniacal, mon bacille du type *Proteus*, étudié comparativement à *B. subtilis*, se développe aussi bien avec la glycérine qu'avec la mannite; dans les deux cas et avec les deux microorganismes il se forme, dès le troisième jour, des substances cuproréductrices à froid dont on peut, quelques jours après, constater la présence dans les distillats par leurs propriétés cuproréductrices et leur pouvoir rotatoire lévogyre.

---

## CHAPITRE II

### FORMATION SUR MILIEU GLYCÉRINÉ D'UNE SUBSTANCE CUPRORÉDUCTRICE LÉVOGYRE ET VOLATILE, L'ALDÉHYDE L-GLYCÉRIQUE

---

La formation de produits cuproréducteurs par divers micro-organismes cultivés dans des milieux contenant de la glycérine a été signalée par divers auteurs.

PÉRÉ (17) a constaté, en 1896, que sous l'influence de certains microbes tels que *Bacillus mesentericus vulgatus*, *Bacillus subtilis* et surtout *Tyrothrix tenuis*, les milieux contenant soit de la glycérine, soit même certains glycérides ou polysaccharides, donnent lieu à la formation d'aldéhyde l-glycérique qui, par oxydation nitrique, a pu être transformé en acide d-glycérique<sup>(1)</sup>.

Deux ans plus tard, G. BERTRAND (4), (5) a observé que la bactérie du sorbose (*Bacterium Xylinum*) ainsi que l'*Azotobacter suboxydans* cultivés sur un milieu glycériné à 5 ou 6 p. 100 fournissent avec des rendements pouvant aller jusqu'à 30 p. 100.

1. La présence de l'aldéhyde l-glycérique n'a été rigoureusement constatée par PÉRÉ que dans les distillats provenant de ses cultures ; cet auteur ne semble pas s'être préoccupé de constater l'existence de cet aldéhyde à l'état libre aussi bien dans les cultures renfermant de la glycérine que dans celles contenant des sucres divers (p. 422 à 424). Toutefois, à la fin de son mémoire (p. 440), PÉRÉ a étudié les variations du pouvoir rotatoire en fonction du temps de culture et c'est bien sur le milieu de culture lui-même que cette constatation du pouvoir lévogyre a été faite.

la dioxyacétone; il en est de même si l'on cultive des microbes voisins sur une hexite telle que la mannite (6); le glucose lui-même peut être transformé en dioxyacétone par le *Bacillus roseus vini* isolé de certains vins algériens (7).

Les substances cuproréductrices ainsi formées présentent la particularité d'exercer leur action réductrice à froid et d'être entraînaibles à la vapeur d'eau; elles se distinguent, par conséquent, très nettement de substances réductrices fixes qui se forment par les processus biosynthétiques mis en œuvre par les microbes et dont l'action réductrice ne se manifeste qu'à chaud. C'est ainsi que RENFREW et JOHNSON (12) ont constaté que le bacille tuberculeux cultivé sur un milieu minéral et glycérimé ne contenant comme source d'azote que de l'asparagine et du citrate d'ammonium [milieu de LONG (14)], commence à former, après trois semaines, des substances réduisant la liqueur de FEHLING, mais seulement à chaud; la teneur va en croissant pendant les semaines suivantes<sup>1</sup>. Comme j'ai tenu à le contrôler moi-même, il n'y a, à aucun moment, formation de substances cuproréductrices à froid et volatiles à la vapeur d'eau.

En 1910, FERNBACH (11) a constaté que les macérations de *Tyrophthrix tenuis* oxydent les alcools polyatomiques et notamment la glycérine, mais avec moins d'intensité que ne le font les cultures elles-mêmes déjà étudiées à ce point de vue par PÉRÉ. Pour FERNBACH la substance réductrice formée à partir de la glycérine serait la dioxyacétone car il a pu la transformer en méthylglyoxal. Mais cette propriété appartient également à l'aldéhyde glycérique si bien que les résultats de FERNBACH n'infirmement nullement ceux de PÉRÉ qui a pu caractériser l'aldéhyde l-glycérique par son pouvoir rotatoire et sa transformation en acide d-glycérique.

D'autre part, sous la direction du D<sup>r</sup> A. BERTHELOT (3) qui a fait une étude importante des diverses races de *Proteus*, VALLE

1. Ces substances sont vraisemblablement les mêmes pentoses ou hexoses (arabinose, galactose, mannose) que certains auteurs (MAXIM, RENFREW, CHAGAFF et ANDERSON, ANDERSON et ROBERTS) ont trouvées dans l'hydrolyse des hydrates de carbone existant dans les lipoides bacillaires.

MIRANDA (20) a observé que deux races V et M de *Proteus vulgaris* transforment la glycérine des milieux de culture en une substance cuproréductrice à froid qu'il considère comme la dioxyacétone.

Tout récemment, CHALLENGER (8) a constaté qu'en cultivant l'*Aspergillus niger* sur un milieu minéral contenant 5 p. 100 de glycérine, il se forme, après trois semaines, et plus intensément après six semaines, des substances cuproréductrices qu'il considère comme de l'aldéhyde glycérique ou de la dioxyacétone, car, par chauffage avec la phénylhydrazine des milieux de culture filtrés, cet auteur a obtenu à chaud une osazone fusible à 131°, qui a été identifiée avec celle que fournit dans les mêmes conditions la dioxyacétone. Toutefois, dans cette étude, la formation d'aldéhyde l-glycérique, quoique très probable, n'a pas été démontrée par ces trois caractères essentiels : coloration du réactif de Schiff, pouvoir rotatoire et transformation en acide glycérique.

A mon tour, j'ai pu constater qu'en cultivant sur divers milieux synthétiques glycinés le bacille du type *Proteus* isolé par moi, il se forme des substances cuproréductrices dont la présence est manifeste soit dans les milieux de culture eux-mêmes, soit dans les liquides limpides obtenus en soumettant ces milieux à la distillation à feu nu ou à l'entraînement à la vapeur d'eau. J'ai pu montrer que l'une au moins de ces substances réductrices, et il n'en existe peut-être qu'une, est constituée par l'aldéhyde l-glycérique.

J'étudierai successivement la caractérisation de l'aldéhyde glycérique, d'une part, directement dans les milieux de culture eux-mêmes, d'autre part, dans les liquides limpides et incolores obtenus par la distillation de ces milieux. Nous verrons, en effet, un peu plus loin, que, contrairement aux données de WOHL (21) et de NEUBERG (16), l'aldéhyde glycérique est entraînable à la vapeur d'eau, assez lentement d'ailleurs, et que, comme l'avait constaté PÉRÉ, on peut ainsi séparer cet aldéhyde à l'état relativement pur des milieux de culture qui le renferment.

## I. — Caractérisation de l'aldéhyde l-glycérique dans les milieux de culture.

La caractérisation de l'aldéhyde l-glycérique dans les milieux de culture a pu être effectuée soit par la mise en évidence de certaines propriétés relativement spécifiques de cet aldéhyde, comme la coloration du réactif de Schiff ou le pouvoir rotatoire lévogyre qui, joints à la volatilité par la vapeur d'eau, constituent déjà des caractères suffisamment typiques, soit par des réactions moins spécifiques comme le pouvoir cuproréducteur et la formation de phénylosazone qui s'appliquent toutes deux aussi bien à l'aldéhyde glycérique qu'à la dioxycétone.

Il ne m'a pas été possible de mettre en évidence la présence de la dioxycétone (15). Il en est de même du méthylacétylcarbinol dont on aurait pu, à la rigueur, supposer l'existence à cause de ses propriétés réductrices et de son pouvoir rotatoire probable; j'ai pu montrer que ce cétole n'existe pas dans les milieux cupro-réducteurs en effectuant sur ceux-ci la réaction de LEMOIGNE qui s'est montrée négative.

J'examinerai successivement chacune des propriétés caractéristiques signalées ci-dessus, à savoir : propriétés cuproréductrices, formation d'osazone, coloration du réactif de SCHIFF et pouvoir rotatoire.

1° PROPRIÉTÉS CUPRORÉDUCTRICES. — Les propriétés cuproréductrices des milieux de culture se manifestent dès le troisième jour qui suit l'ensemencement et le maintien à l'étuve à 37°. Elles nécessitent alors le chauffage de la liqueur de Fehling avec 1 ou 2 cm<sup>3</sup> du milieu. Dans les jours qui suivent la quantité de substance réductrice formée augmente rapidement et l'on peut alors obtenir la réduction de la liqueur cupropotassique à la température ordinaire soit par simple mélange, soit de préférence, en déposant à la surface du réactif 1 ou 2 cm<sup>3</sup> du milieu, ce qui rend la réaction beaucoup plus sensible. Suivant la quantité de substance réductrice, cette réaction peut se produire en

quelques minutes ou au cours de la demi-heure qui suit la mise en réaction. Le pouvoir cuproréducteur a d'ailleurs été évalué rigoureusement en recourant à la méthode de BERTRAND.

A 40 cm<sup>3</sup> du mélange cupropotassique, on ajoute, suivant la richesse en substance réductrice, 5 à 20 cm<sup>3</sup> du milieu stérilisé et filtré; on porte à l'ébullition trois minutes; puis suivant la technique habituelle on sépare l'oxyde cuivreux; on le dissout dans le sulfate ferrique et on titre par le permanganate le sulfate ferreux formé. Le pouvoir cuproréducteur est exprimé en quantité de cuivre réduit par 100 cm<sup>3</sup> ou par litre de liquide de culture. J'ai ainsi trouvé dans les milieux les plus riches des quantités qui sont au voisinage de 0 gr. 50 de cuivre pour 100 cm<sup>3</sup>. Comme on le verra dans les tableaux publiés dans le chapitre suivant, lorsqu'on effectue de tels titrages à diverses périodes de la culture de manière à suivre les variations de la substance cuproréductrice, on constate que la teneur en cette substance croît rapidement du troisième au cinquième jour et qu'elle atteint un maximum qui se manifeste vers la fin de la première ou de la deuxième semaine; après quoi cette teneur décroît peu à peu, ce qui implique que le microbe a subi une modification dans sa vitalité et qu'à partir d'un certain moment il utilise la substance réductrice. Il semble même, comme l'avait déjà observé PÉRE pour les cultures de *Tyrothrix tenuis* sur milieux contenant de la glycérine ou de la mannite, que le microorganisme s'accoutume à détruire l'aldéhyde glycérique et que les cultures provenant de repiquages successifs présentent leur maximum de pouvoir réducteur à des périodes de plus en plus précoces, par exemple à la fin de la première semaine au lieu de la fin de la seconde.

Les variations de la teneur en cette substance par rapport aux modifications de l'acidité et du pH du milieu ainsi que par rapport à la consommation en azote seront étudiées dans le chapitre III à la fin de ce travail.

2° FORMATION D'OSAZONE. — La substance cuproréductrice peut être caractérisée directement dans le milieu de culture

par la formation d'osazone. 10 cm<sup>3</sup> de culture stérilisée et filtrée sont chauffés au bain-marie avec 10 cm<sup>3</sup> d'une solution acétique de phénylhydrazine. Après un temps variable suivant la teneur en substance réductrice, il se forme un dépôt d'osazone; quand cette teneur est faible c'est seulement après refroidissement que l'osazone se dépose. Pour obtenir un produit plus pur, il est préférable d'opérer à froid, mais il faut attendre plusieurs jours.

Pour caractériser cette osazone il importe d'opérer sur une quantité plus importante de milieux ayant cultivé au moins pendant cinq à dix jours. 100 cm<sup>3</sup> de liquide stérilisé et filtré sont additionnés de 100 cm<sup>3</sup> de solution acétique de phénylhydrazine à 5 % obtenue en dissolvant le réactif dans parties égales d'eau et d'acide acétique cristallisable. On porte au bain-marie ou à l'étuve à 37°. Dans le premier cas après vingt minutes de chauffage et plus tardivement dans le second cas, on voit des paillettes se former peu à peu. Quand la formation de ces paillettes cesse, on filtre et le précipité est lavé d'abord avec de l'acide acétique à 50 % puis avec de l'eau distillée. Le précipité est séché sur le vide sulfurique. On le fait alors cristalliser une ou deux fois dans le benzène. On obtient ainsi une osazone parfaitement incolore ou faiblement colorée en jaune pâle, dont le point de fusion au bloc Maquenne est, conformément aux données de BERTRAND, de 142° (1). Un mélange avec la même osazone préparée avec la dioxyacétone ne présente pas d'abaissement du point de fusion. Pour un milieu dont le pouvoir cuproréducteur correspondait à environ 1 gr. de cuivre pour 100 cm<sup>3</sup> la quantité d'osazone formée a atteint près de 40 centigr., ce qui représente environ 20 centigr. d'aldéhyde glycérique ou d'un mélange de cet aldéhyde et de dioxyacétone.

3° RECOLORATION DU RÉACTIF DE SCHIFF. — On sait que l'une des propriétés caractéristiques de l'aldéhyde glycérique, notam-

1. Dans la plupart des cas j'ai également isolé un produit très peu soluble dans le benzène et fusible à 240° au bloc Maquenne et qui pourrait être l'osazone d'un sucre formé par synthèse.

ment par rapport aux substances réductrices de constitution voisine comme la dioxyacétone ou le méthylacétylcarbinol, est sa faculté de colorer le réactif de SCHIFF. Il est curieux cependant que PÉRÉ, qui a certainement eu en mains des cultures et des solutions aqueuses riches en aldéhyde glycérique, n'ait pas observé cette réaction, bien que son réactif fût assez sensible pour donner une réaction positive avec le produit de décomposition de cet aldéhyde glycérique, produit que PÉRÉ supposait devoir contenir de l'aldéhyde formique. Il est fort probable que le réactif employé par PÉRÉ était d'une sensibilité insuffisante.

Il est également curieux que CHALLENGER (8) qui a observé la formation de substances cuproréductrices par la culture de l'*Aspergillus niger* sur des milieux glycinés n'ait pas songé à examiner l'action de ces cultures sur le réactif de SCHIFF, ce qui lui aurait permis de décider si son milieu contenait, soit seulement de la dioxyacétone dans le cas d'une réaction négative, soit de l'aldéhyde glycérique ou un mélange de celui-ci avec la dioxyacétone dans le cas d'une réaction positive.

J'ai toujours constaté à partir du quatrième ou cinquième jour une recoloration du réactif de SCHIFF se produisant il est vrai plus ou moins lentement. J'ai toujours opéré comme il suit : 5 cm<sup>3</sup> de milieu stérilisé et filtré sont introduits dans un tube à essai et additionnés de I à II gouttes de réactif de SCHIFF. Après un temps variable suivant la concentration en substances réductrices et généralement déjà après quinze à vingt minutes, la coloration rose est manifeste et va en augmentant.

Cette recoloration est d'ailleurs beaucoup plus caractéristique lorsqu'on l'effectue comme nous l'exposerons plus loin sur le distillat obtenu à partir de ce milieu.

4° POUVOIR ROTATOIRE. — L'examen direct des milieux de culture après stérilisation et filtration montre l'existence d'un pouvoir rotatoire lévogyre qui est manifeste dès le troisième ou le quatrième jour et qui devient maximum vers la fin de la deuxième semaine. L'examen polarimétrique a été fait sans

décoloration préalable au noir animal en des tubes de 20 cm. ou de 50 cm. suivant la visibilité au travers de ces tubes. Pour que les résultats soient comparables, j'ai toujours ramené par le calcul les déterminations faites en tubes de 50 cm. à ce qu'elles seraient en tubes de 20 cm. en en prenant les deux cinquièmes.

PÉRÉ, qui a étudié les variations du pouvoir rotatoire des cultures de *Tyrophthrix tenuis* effectuées sur du bouillon glycérimé à 5 p. 100, a constaté des déviations allant en croissant jusqu'à consommation complète de la glycérine, ce qui demandait en général quarante-cinq jours d'étuve à 34-35°. La date d'apparition des propriétés rotatoires n'a pas été indiquée par PÉRÉ; mais cet auteur signale qu'au quinzième jour la déviation en tube de 20 cm. était de  $-1^{\circ}6'$ , puis passait à  $-1^{\circ}36'$  au trentième jour pour atteindre finalement  $-2^{\circ}8'$  au quarante-cinquième jour.

Les déviations les plus élevées que j'ai obtenues n'ont jamais dépassé  $-35'$ ; généralement, le pouvoir rotatoire lévogyre était manifeste dès le deuxième ou le troisième jour (déviation de  $-9$  à  $-12'$ , en tubes de 50 cm., soit de  $-2$  à  $-3'$  en rapportant à un tube de 20 cm.); les jours suivants, la déviation lévogyre augmentait assez rapidement pour atteindre 25 à 30' au cinquième ou au sixième jour, après quoi cette déviation diminuait peu à peu.

Ces différences de comportement peuvent s'expliquer par ce fait que mes déterminations de pouvoir rotatoire ont été effectuées sur des cultures obtenues avec un bacille provenant de réensemencements successifs sur les mêmes milieux synthétiques et non en recourant à une souche originelle entretenue par culture sur bouillon non glycérimé ou sur pomme de terre. PÉRÉ a pu constater en effet des différences considérables, toujours avec *Tyrophthrix tenuis*, suivant que le microbe employé pour la culture provenait d'une souche originelle sur bouillon non glycérimé ou d'une souche ayant déjà cultivé sur milieu glycérimé. On trouvera ci-après les déviations observées par PÉRÉ sur les deux différentes cultures (*loc. cit.*, p. 440-441).

| DURÉE<br>de la culture | <i>Tyrophrix tenuis</i><br>originel | <i>Tyrophrix tenuis</i><br>au                 |
|------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------------------|
|                        |                                     | deuxième passage<br>sur bouillon<br>glycériné |
| —                      | —                                   | —                                             |
| 15 jours . . . . .     | — 1°6'                              | — 1°46'                                       |
| 30 jours . . . . .     | — 1°36'                             | — 1°24'                                       |
| 45 jours . . . . .     | — 2°8'                              | — 1°2'                                        |

Moi-même, j'ai pu constater que les dernières cultures faites par réensemencements successifs atteignaient plus vite leur maximum en aldéhyde glycérique que les cultures faites par moi antérieurement.

## II. — Caractérisation de l'aldéhyde glycérique dans le distillat aqueux des milieux de culture.

La présence de l'aldéhyde glycérique dans le distillat aqueux des milieux de culture a pu être mise en évidence très nettement par PÉRÉ qui a non seulement constaté les propriétés cuproréductrices de ce distillat, mais qui a pu, par oxydation nitrique, transformer l'aldéhyde lévogyre en acide dextrogyre, l'acide d-glycérique, sans démontrer d'ailleurs que cet aldéhyde glycérique préexistait dans le milieu soumis à la distillation. Cette volatilité de l'aldéhyde glycérique par entraînement à la vapeur d'eau que j'ai constatée moi-même dès le début de mes recherches est en contradiction avec les faits énoncés par WOHL (21) et par NEUBERG (16). Cet auteur a constaté en effet que l'aldéhyde glycérique ne peut pas être décelé dans les liquides entraînés lors de la distillation des solutés hydroalcooliques de cet aldéhyde pour en éliminer l'alcool. Or, il est fort probable que dans la distillation réalisée par ces auteurs le chauffage a été modéré, si bien que l'entraînement de l'aldéhyde glycérique n'a pas pu avoir lieu, mais si l'on distille à feu nu comme l'a fait PÉRÉ, ou même si l'on entraîne comme je l'ai fait moi-même par un fort courant de vapeur d'eau, la volatilité de l'aldéhyde glycérique n'est pas discutable puisque le distillat présente comme je le montrerai ci-après tous les caractères de cet aldéhyde, à savoir, propriétés cuproréduc-

trices, pouvoir rotatoire, formation de phénylosazone et coloration du réactif de Schiff.

Ainsi que je l'exposerai ci-après les premiers produits entraînés sont toujours plus riches que les suivants, la richesse en aldéhyde glycérique étant évaluée par la détermination soit du pouvoir réducteur, soit de la déviation polarimétrique.

Dans mes essais, j'ai toujours opéré de la façon suivante. Dans un ballon de 1/2 litre contenant environ 150 à 200 cm<sup>3</sup> de culture stérilisée et filtrée, j'ai ajouté environ 50 gr. de NaCl afin de faciliter éventuellement l'entraînement de l'aldéhyde. Ce ballon est disposé de façon à réaliser à la fois l'arrivée de la vapeur d'eau et le départ de la vapeur entraînée qui est condensée ensuite dans un bon réfrigérant. Avant de faire passer la vapeur, on porte le ballon à la température de l'ébullition par chauffage à feu nu; puis, on diminue la flamme et on fait arriver la vapeur. On recueille le liquide distillé par fractions de 20 cm<sup>3</sup>, et sur ces fractions on effectue soit les diverses déterminations qui seront indiquées ci-après, soit exclusivement l'essai qualitatif du pouvoir réducteur. Dans certains cas, on a poursuivi la distillation jusqu'à obtention d'un volume de distillat égal à celui du liquide soumis à l'entraînement. On constate alors que les derniers centimètres cubes entraînés ont encore un faible pouvoir réducteur.

J'ai d'ailleurs tenu à vérifier que l'aldéhyde glycérique obtenu synthétiquement est entraînable par la vapeur d'eau. A cet effet, j'ai réalisé l'oxydation de la glycérine par la méthode FENTON, modifiée par WITZEMANN (10). 100 gr. de glycérine sont dissous dans 100 cm<sup>3</sup> d'eau et on ajoute 10 gr. de sulfate ferreux. On fait alors tomber très lentement (en neuf heures) 1 molécule 25 d'eau oxygénée à 5,89 p. 100 en ne dépassant pas la température de 8 à 10°; on laisse reposer vingt-quatre heures et on neutralise par le carbonate de chaux. Le liquide filtré est alors entraîné à la vapeur d'eau de manière à recueillir environ 125 à 150 cm<sup>3</sup> de liquide. Ce liquide est très légèrement acide. On ajoute un peu de carbonate de chaux pour saturer l'acidité. On filtre et on épuise à l'éther, dans le but

d'éliminer les produits solubles dans ce solvant alors que l'aldéhyde glycérique l'est extrêmement peu; on soumet alors le liquide aqueux dont on a chassé l'éther à un fort entraînement à la vapeur d'eau; celui-ci est poursuivi de manière à recueillir environ 200 cm<sup>3</sup> de distillat dont toutes les fractions colorent le Schiff, réduisent immédiatement à froid la liqueur de Fehling et enfin réagissent avec la phénylhydrazine pour donner une phénylosazone typique. La volatilité de l'aldéhyde glycérique est donc bien établie.

1<sup>o</sup> PROPRIÉTÉS CUPRORÉDUCTRICES DES DISTILLATS. — Les propriétés réductrices des distillats de cultures sur milieu glyceriné de mon bacille du type *Proteus* ont été le plus souvent examinées au point de vue qualificatif; dans quelques cas seulement j'ai fait des déterminations quantitatives.

La recherche qualitative a été faite comme il a été dit plus haut en introduisant dans un petit tube à essai 2 ou 3 cm<sup>3</sup> de liqueur de Fehling, puis à la surface de celle-ci 1/2 cm<sup>3</sup> du distillat; il se produit bientôt à la limite des deux liquides un précipité jaune dont la formation est d'autant plus rapide et plus abondante que le distillat est riche en aldéhyde glycérique. Les premiers distillats sont toujours les plus riches; puis les suivants le sont de moins en moins. J'ai constaté plusieurs fois qu'après avoir recueilli un volume de distillat double de celui du milieu entraîné, les derniers centimètres cubes distillés sont encore faiblement et lentement réducteurs à froid; il en est de même du liquide soumis à l'entraînement.

L'étude quantitative permet de fixer le rythme de la volatilisation de l'aldéhyde glycérique. On opère comme plus haut, en recourant à la méthode de BERTRAND et en déterminant pour chaque fraction la quantité de cuivre réduit (exprimée en cuivre métallique et pour 100 cm<sup>3</sup> de distillat).

Dans quelques cas (p. 28 et 29) on a sur les diverses portions fournies par la même distillation, effectué simultanément la détermination du pouvoir réducteur et de la déviation polarimétrique.

A. — *Distillation à la vapeur d'eau de 100 cm<sup>3</sup> du milieu 1143.*

|                                                   | POUVOIR RÉDUCTEUR<br>exprimé<br>en gramme de Cu<br>pour 100 cm <sup>3</sup> |
|---------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| Milieu soumis à l'entraînement . . . . .          | 0,3939                                                                      |
| Première fraction (22 cm <sup>3</sup> ) . . . . . | 0,5545                                                                      |
| Deuxième fraction (23 cm <sup>3</sup> ) . . . . . | 0,3999                                                                      |
| Liquide résiduel (110 cm <sup>3</sup> ) . . . . . | 0,2366 <sup>(1)</sup>                                                       |

B. — *Distillation à la vapeur d'eau de 200 cm<sup>3</sup> de liquide provenant d'une distillation préalable du milieu 1954.*

|                                                    | POUVOIR RÉDUCTEUR<br>exprimé<br>en gramme de Cu<br>pour 100 cm <sup>3</sup> |
|----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| Liquide soumis à l'entraînement. . . . .           | 0,478                                                                       |
| Première fraction (25 cm <sup>3</sup> ) . . . . .  | 0,9214                                                                      |
| Deuxième fraction (25 cm <sup>3</sup> ) . . . . .  | 0,5999                                                                      |
| Troisième fraction (25 cm <sup>3</sup> ) . . . . . | 0,3939                                                                      |
| Liquide résiduel (200 cm <sup>3</sup> ) . . . . .  | »                                                                           |

L'examen des résultats exposés ci-dessus montre que pour obtenir un distillat dont le pouvoir réducteur soit sensiblement le double du liquide soumis à l'entraînement il faut recueillir environ le huitième de ce liquide. Dès le troisième huitième, le distillat d'abord sensiblement de même titre que le liquide initial devient peu à peu d'un titre légèrement inférieur. On ne peut donc par cette méthode obtenir des liquides très riches, d'autant qu'il n'est pas prouvé que, pour des concentrations plus fortes, on retrouvera à la distillation les mêmes proportions d'enrichissement.

2° FORMATION DE PHÉNYLOSAZONE. — Pour cet essai, on peut opérer comme il suit. A 30 cm<sup>3</sup> de la deuxième fraction (n° 1954) dont le pouvoir réducteur exprimé en cuivre réduit est de 0,6, on ajoute 50 cm<sup>3</sup> d'un soluté contenant phénylhydrazine 6 gr.,

1. Le poids de Cu réduit a été trouvé de 0,2151 p. 100; mais, comme le volume du liquide résiduel avait augmenté d'un dixième, j'ai augmenté d'un dixième le pourcentage de cuivre réduit.

acide acétique 70 gr., eau 40 gr. On abandonne à la température du laboratoire. Il se dépose peu à peu des cristaux d'osazone. Après trois jours, on filtre, on lave, on sèche et on pèse. On obtient ainsi 25 centigr. d'osazone dont le point de fusion, après recristallisation dans le benzène, est de 142° au bloc Maquenne. On a ainsi identifié l'aldéhyde glycérique (<sup>1</sup>).

3° TRANSFORMATION EN MÉTHYLGLYOXAL. — J'ai suivi les indications de NEUBERG (16). A 25 cm<sup>3</sup> de distillat riche en aldéhyde glycérique, on ajoute en refroidissant 5 gr. d'acide sulfurique, puis on chauffe doucement et à feu nu de manière à recueillir 10 cm<sup>3</sup> de distillat dans lequel se trouve le méthylglyoxal provenant de la déshydratation de l'aldéhyde glycérique :



Pour caractériser le méthylglyoxal, on le transforme en nitrophénylosazone; les 15 cm<sup>3</sup> de distillat sont mélangés à 10 cm<sup>3</sup> d'une solution acétique et alcoolique de nitrophénylhydrazine; il se forme aussitôt un léger précipité d'hydrazone; on chauffe une demi-heure à une heure au bain-marie pour réaliser la transformation en osazone d'un rouge écarlate caractéristique. Le point de fusion au bloc Maquenne est de 330° (302-304° au tube).

4° RECOLORATION DU RÉACTIF DE SCHIFF. — J'ai opéré comme pour les essais effectués directement sur les milieux de culture stérilisés et filtrés. 2 ou 3 cm<sup>3</sup> de distillat limpide introduits dans un petit tube à essai sont additionnés d'une goutte ou deux de réactif de Schiff. Après quelques minutes, il se développe une coloration rosée d'abord faible et visible surtout dans l'axe

1. La dioxycétone donne la même phénylosazone, mais elle n'est pas douée, comme le liquide essayé ci-dessus, de pouvoir rotatoire. Il ne semble pas qu'on puisse supposer que le pouvoir rotatoire soit dû à une autre substance que la substance réductrice. Ici également on observe parfois une osazone peu soluble dans le benzène et fusible à 240° (voir p. 20).

du tube; elle croît peu à peu et atteint son maximum après quelques heures. Cette réaction est très importante, car elle n'appartient ni à la dioxyacétone ni au méthylacétylcarbinol. Elle s'est montrée positive avec tous mes distillats, notamment avec les premières fractions. J'ai déjà signalé au début de ce chapitre les résultats négatifs obtenus par PÉRÉ et qui ne peuvent s'expliquer que par un réactif insuffisamment sensible.

5° **POUVOIR ROTATOIRE.** — La détermination du pouvoir rotatoire des distillats a été effectuée le plus souvent directement sans qu'il soit nécessaire de procéder à une filtration préalable. Comme les fractions étaient d'environ 20 à 25 cm<sup>3</sup>, cette détermination a été faite dans un tube de 20 cm.; ce n'est que lorsque je disposais d'une plus grande quantité de liquide que j'opérais avec un tube de 50 cm., mais dans ce cas les déterminations ont été rapportées par le calcul à un tube de 20 cm.

Dans la plupart des distillations, la première fraction a été plus fortement lévogyre que le milieu initial; mais cependant dans certains cas cette première fraction ne s'est pas montrée très différente; cela tient sans doute à ce que l'entraînement à la vapeur d'eau n'a pas toujours été réalisé avec la même intensité; j'ai observé un fait analogue en ce qui concerne le pouvoir réducteur, notamment dans un cas où le liquide de culture produisait par chauffage une mousse abondante m'obligeant à restreindre la vitesse de l'entraînement.

Je rapporte ci-après deux cas dans lesquels l'enrichissement de la première fraction a été très net pour l'un et nul pour l'autre.

1° *Distillation à la vapeur de 200 cm<sup>3</sup> du liquide 1953.*

|                                             | DÉVIATION EN TUBE<br>de 20 cm. | POUVOIR RÉDUCTEUR<br>exprimé<br>en gramme de Cu<br>pour 100 cm <sup>3</sup> |
|---------------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| Liquide de culture . . . . .                | — 24'                          | 1 gr. 04                                                                    |
| Première fraction (30 cm <sup>3</sup> ) . . | — 30'                          | 1 gr. 25                                                                    |
| Deuxième fraction (30 cm <sup>3</sup> ). .  | — 22'                          | 0 gr. 90                                                                    |

D'autre part 200 cm<sup>3</sup> de distillats réunis et provenant d'une autre portion du même liquide 1953 (0,478 de Cu réduit par 100 cm<sup>3</sup>) ont été distillés à nouveau et ont fourni les fractions suivantes :

|                                                     | DÉVIATION EN TUBE<br>de 20 cm. | POUVOIR RÉDUCTEUR<br>exprimé<br>en gramme de Cu<br>pour 100 cm <sup>3</sup> |
|-----------------------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| Liquide initial . . . . .                           | — 21'                          | 0,478                                                                       |
| Première fraction (25 cm <sup>3</sup> ) . . . . .   | — 31'                          | 0,9211                                                                      |
| Deuxième fraction (25 cm <sup>3</sup> ) . . . . .   | — 26'                          | 0,5999                                                                      |
| Troisième fraction (50 cm <sup>3</sup> ) . . . . .  | — 13'                          | 0,3939                                                                      |
| Quatrième fraction (100 cm <sup>3</sup> ) . . . . . | — 3'                           | Non titrée.                                                                 |
| Résidu de 200 cm <sup>3</sup> . . . . .             | »                              | 0,0606                                                                      |

Sur la troisième fraction (— 13') j'ai étudié l'influence d'une distillation à feu nu effectuée de manière à recueillir, soit la moitié, soit le tiers du liquide soumis à la distillation. Dans le premier cas, le distillat présentait une déviation de — 15', soit un enrichissement d'un quart; dans le deuxième cas, la déviation était de — 19', soit un enrichissement de près de 50 %.

2° Distillation à la vapeur de 140 cm<sup>3</sup> du liquide 1142.

|                                                    | DÉVIATION EN TUBE<br>de 20 cm. |
|----------------------------------------------------|--------------------------------|
| Liquide initial . . . . .                          | — 15'                          |
| Première fraction (30 cm <sup>3</sup> ) . . . . .  | — 15'                          |
| Deuxième fraction (28 cm <sup>3</sup> ) . . . . .  | — 11'                          |
| Troisième fraction (33 cm <sup>3</sup> ) . . . . . | — 4'                           |

On voit que les déviations que j'ai observées avec mes distillats sont loin d'atteindre le chiffre de — 1°36' indiqué par PÉRÉ (*loc. cit.*, p. 425) pour le distillat d'une culture de *Tyrophthrix tenuis* sur bouillon glycérimé à 5 %. Il est vrai que les déviations présentées par les milieux de PÉRÉ, après quinze jours de culture, dépassaient toujours 1° et atteignaient après quarante-cinq jours jusqu'à 2° pour lesensemencements effectués avec la souche originelle. D'autre part, PÉRÉ opérait toujours par distillation à feu nu et non par entraînement à la vapeur d'eau; enfin, cet auteur ne donne aucun renseignement sur les

quantités de liquide mises à distiller ainsi que sur les quantités de distillat obtenues. On ne peut donc pas comparer ses résultats avec les miens, mais on peut déduire de mes recherches que, pour les milieux de cultures que j'ai eus à ma disposition et dont la teneur en aldéhyde l-glycérique étaient relativement faibles ( $1/2$  % de cuivre réduit), l'entraînement à la vapeur d'eau, s'il est conduit énergiquement, fournit, dans une première fraction représentant environ le sixième ou le huitième du liquide distillé, un enrichissement qui peut atteindre jusqu'à deux fois la quantité initiale.

6° SOLUBILITÉ DANS L'ÉTHER. — 17 cm<sup>3</sup> du distillat (première fraction) provenant du milieu de culture 1953 et possédant une déviation de  $-30'$  en tube de 20 cm. (pouvoir réducteur pour 100 cm<sup>3</sup> = 0 gr. 924) ont été saturés à froid de chlorure de sodium et épuisés à quatre reprises par 20 à 25 cm<sup>3</sup> d'éther chaque fois. On a ainsi obtenu environ 90 cm<sup>3</sup> d'éther qu'on a séchés sur du sulfate de soude. L'éther filtré examiné au polarimètre en tube de 50 cm a présenté une déviation de  $-7'$ . Après évaporation de l'éther, le résidu réduit faiblement à chaud la liqueur de Fehling. Ainsi, la substance réductrice lévogyre passe en faibles proportions dans l'éther.

---

## CHAPITRE III

### ÉTUDE DES VARIATIONS DE COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURE AU COURS DU DÉVELOPPEMENT

---

Dans cette étude qui a surtout pour objet de suivre les variations quantitatives de la substance cuproréductrice et lévogyre, je me suis borné à effectuer parallèlement quelques déterminations simples telles que l'acidité et le  $pH$  ainsi que la teneur en ammoniacque.

Comme je l'ai exposé dans le chapitre précédent, les propriétés cuproréductrices ont été évaluées d'après les quantités de cuivre réduit qui sont formées en employant la méthode de Gabriel BERTRAND.

La déviation optique a été examinée au grand polarimètre de JOBIN et YVON avec lampe à vapeur de mercure dont on utilise la longueur d'onde 5780 (voisine de la raie D) tantôt en tube de 50 cm., tantôt en tube de 20 cm., mais toujours ramenée à une même épaisseur de 20 cm. L'ammoniacque a été dosée très simplement par un titrage acidimétrique effectué sur 5 cm<sup>3</sup> de liquide après que celui-ci a été amené à la neutralité à la phtaléine et après addition de 10 cm<sup>3</sup> de formol préalablement neutralisé. On sait qu'on dose ainsi à la fois l'ammoniacque et les aminoacides, mais pour suivre les cultures pendant les quinze ou vingt premiers jours cette méthode est suffisante.

L'acidité à la phtaléine a été déterminée, soit dans un essai spécial, soit dans la première partie de l'essai précédent, en employant la soude décijnormale; comme les liquides examinés étaient limpides et incolores ou peu colorés, j'ai toujours pris comme virage la teinte rose pâle. Quant au  $pH$ , il a été déterminé par l'emploi des colorants suivants : 1-2-4 dinitrophénol;

1-2-5 dinitrophénol; 1-2-6 dinitrophénol; paranitrophénol et métanitrophénol.

Les résultats que j'ai obtenus sur trois cultures successives ont été rassemblés dans les trois tableaux suivants :

TABLEAU I. — *Milieu synthétique glycéiné*  
contenant 2 ‰ de sulfate d'ammonium,ensemencé le 11 avril  
et maintenu à l'étuve à 37° jusqu'au 4 mai.

|                                                                                  |                      |                      |                      |         |
|----------------------------------------------------------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|---------|
| Numéros des prélèvements . . .                                                   | 1140                 | 1141                 | 1142                 | 1143    |
| Dates . . . . .                                                                  | 11 avril.            | 16 avril.            | 21 avril.            | 4 mai.  |
| pH . . . . .                                                                     | 6,9                  | 5,4                  | 4,6                  | 4,6     |
| Acidité à la phtaléine en NaOH<br>par litre . . . . .                            | 0,36                 | 0,60                 | 0,72                 | 0,74    |
| Acidité à la phtaléine en milli-<br>molécules de NaOH par litre. .               | 9,0                  | 15,0                 | 18,0                 | 18,5    |
| Acidité après formol en soude N/10<br>pour 5 cm <sup>3</sup> de liquide. . . . . | 2 cm <sup>3</sup> 95 | 2 cm <sup>3</sup> 30 | 1 cm <sup>3</sup> 95 | »       |
| NH <sup>3</sup> en millimolécules par litre .                                    | 30,5                 | 23,8                 | 20,2                 | »       |
| Déviati on polarimétrique en tube<br>de 20 cm. . . . .                           | »                    | — 6'                 | — 15'                | — 10'   |
| Pouvoir cuproréducteur en grammes<br>de Cu par litre . . . . .                   | »                    | Non examiné.         | 6 gr. 6              | 3 gr. 9 |

TABLEAU II. — *Milieu synthétique glycéiné*  
contenant 2 ‰ de sulfate d'ammonium,ensemencé le 4 mai  
et maintenu à l'étuve à 37° jusqu'au 21 mai.

|                                                                                   |                     |                      |                      |                      |                      |
|-----------------------------------------------------------------------------------|---------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Numéros des prélè-<br>vements . . . . .                                           | 450                 | 451                  | 452                  | 453                  | 454                  |
| Dates. . . . .                                                                    | 4 mai.              | 6 mai.               | 9 mai.               | 13 mai.              | 21 mai.              |
| pH . . . . .                                                                      | 6,6                 | 5,8                  | 4,5                  | 4,4                  | 5,5                  |
| Acidité à la phta-<br>léine en NaOH par<br>litre . . . . .                        | 0,48                | 0,56                 | 0,64                 | 0,72                 | 0,76                 |
| Acidité à la phta-<br>léine en millimo-<br>lécules de NaOH<br>par litre . . . . . | 12,0                | 14,0                 | 16,0                 | 18,0                 | 19,0                 |
| Acidité après formol en<br>soude N/10 pr 5 cm <sup>3</sup> . . . . .              | 3 cm <sup>3</sup> 0 | 2 cm <sup>3</sup> 75 | 2 cm <sup>3</sup> 55 | 2 cm <sup>3</sup> 35 | 2 cm <sup>3</sup> 60 |
| NH <sup>3</sup> en millimolé-<br>cules par litre. . . . .                         | 31,0                | 28,4                 | 26,4                 | 24,3                 | 26,9                 |
| Déviati on polarimé-<br>trique pour 20 cm. . . . .                                | 0                   | — 3'                 | — 7'                 | — 9'                 | — 8'                 |
| Pouvoir réducteur en Cu<br>réduit pour 1.000. . . . .                             | 0                   | »                    | 3 gr. 211            | 4 gr. 423            | 3 gr. 504            |

TABLEAU III. — *Milieu synthétique glycérimé, contenant 0,30 ‰ d'ammoniaque à l'état de citrate, ensemencé le 19 mai et maintenu à l'étuve à 37° jusqu'au 27 mai.*

| Numéros des prélèvements . . . . .                                      | 1950                 | 1951                 | 1952                 | 1953                 |
|-------------------------------------------------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Dates . . . . .                                                         | 19 mai.              | 21 mai.              | 25 mai.              | 27 mai.              |
| pH . . . . .                                                            | 6,6                  | 6,0                  | 5,6                  | 6,8                  |
| Acidité à la phtaléine en NaOH par litre . . . . .                      | 0,24                 | 0,42                 | 0,28                 | 0,20                 |
| Acidité à la phtaléine en millimolécules de NaOH par litre . . . . .    | 6,0                  | 10,5                 | 7,0                  | 5,0                  |
| Acidité après formol en soude N/10 pour 5 cm <sup>3</sup> . . . . .     | 1 cm <sup>3</sup> 75 | 1 cm <sup>3</sup> 40 | 1 cm <sup>3</sup> 20 | 1 cm <sup>3</sup> 05 |
| Teneur en NH <sup>3</sup> par litre exprimée en millimolécules. . . . . | 8,1                  | 14,5                 | 12,4                 | 10,8                 |
| Déviatiou polarimétrique en tube de 20 cm. . . . .                      | 0                    | — 3'                 | — 25'                | — 24'                |
| Pouvoir réducteur en grammes de Cu par litre . . . . .                  | 0                    | 2 gr. 66             | 11 gr. 6             | 10 gr. 4             |

Les deux premiers tableaux concernent un milieu dans lequel  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  est l'unique source d'azote. Dans le liquide du troisième tableau, ce sel a été remplacé par le citrate d'ammonium. Quelques autres essais ne figurant pas dans ce tableau ont été effectués avec des milieux où le sel d'ammonium a été remplacé par du citrate de magnésium et de l'asparagine.

Pour effectuer les prélèvements aux dates indiquées, je n'ai pas puisé ceux-ci dans le même milieu, ce qui aurait été plus rigoureux, mais ce qui aurait déterminé, comme je m'en suis plusieurs fois rendu compte, une chute du voile et parfois un arrêt ou un retard de la culture. J'ai prélevé chaque fois 3 ou 4 matras sur les 12 ou 15 qui avaient été ensemencés initialement. Les prélèvements ainsi effectués représentent donc la moyenne de 3 ou 4 matras, ce qui permet, je crois, une compensation suffisante des différences individuelles qui peuvent se présenter. J'exposerai ci-après successivement les conclusions que l'on peut formuler d'après l'examen de ces tableaux.

1° VARIATIONS DE LA DÉVIATION POLARIMÉTRIQUE ET DU POUVOIR RÉDUCTEUR. — Dans tous les cas, ces variations ont marché de

pair non seulement entre elles mais par rapport à la consommation d'azote. Les rapports entre la déviation lévogyre et le pouvoir réducteur ont été généralement assez constants; la quantité de Cu réduit s'est montrée en moyenne de 45 centigr. par litre pour une déviation d'une minute. Ce n'est que pour les liquides peu riches, c'est-à-dire prélevés deux ou trois jours après l'ensemencement et présentant des déviations inférieures à  $-5'$ , que ce rapport tend à s'élever (88 centigr. par minute pour le n° 1951 du tableau III).

En général, les propriétés réductrices maxima et les déviations lévogyres les plus élevées ont été atteintes après une dizaine de jours dans les tableaux I et II, et, déjà, après six jours, dans le tableau III. Cela tient sans doute, comme je l'ai déjà rapporté plus haut, à ce que les ensemencements ont été faits par repiquages successifs et non en recourant chaque fois à la même souche originelle (dont je ne disposais pas); aussi peut-on supposer que le bacille s'est accoutumé, comme l'a montré PÉRÉ, à détruire l'aldéhyde glycérique formé.

2° VARIATIONS DE L'AMMONIAQUE. — La consommation d'ammoniaque par le bacille a été généralement assez faible pendant les tout premiers jours; elle paraît croître ensuite assez rapidement, car, dès le cinquième jour, elle atteint, suivant les cas, environ 15 à 30 % de la quantité totale pour ce qui concerne les tableaux I et II, et jusqu'à 40 % pour le milieu du tableau III, c'est-à-dire dans un cas où le sel ammoniacal était le citrate au lieu du sulfate. Ultérieurement, la consommation d'azote ammoniacal paraît diminuer ou devenir nulle. Bien mieux, l'ammoniaque trouvée dans le liquide reste stationnaire ou même augmente légèrement; tout se passe comme si le micro-organisme hydrolysait les composés aminés antérieurement formés par lui, libérant ainsi plus d'ammoniaque qu'il n'en consomme. De toute façon, il s'agit probablement d'une vie ralentie pendant laquelle le bacille consomme relativement peu d'azote ammoniacal et ce ralentissement fonctionnel se traduit, comme on l'a vu plus haut, par l'arrêt de la formation de sub-

stance réductrice et probablement même par la destruction de celle-ci, puisque parallèlement les propriétés réductrices et le pouvoir rotatoire vont en diminuant dès la fin de la première ou de la seconde semaine, suivant les cas.

La diminution progressive de l'ammoniaque observée dès le début de la culture et se manifestant plus aisément à partir du troisième ou du quatrième jour a été constatée par tous les auteurs qui ont opéré sur les milieux synthétiques contenant des sels ammoniacaux (1), (9), (12). Lorsqu'au contraire on opère sur des milieux contenant ces sels associés à l'asparagine ou simplement de l'asparagine seule, on note pendant les premiers jours une augmentation plus ou moins importante de l'ammoniaque. C'est ainsi que, dans le milieu 1950 du tableau III, j'ai remplacé le citrate d'ammonium par du citrate de magnésium et de l'asparagine (2 %), et j'ai constaté que l'acidité après formol qui, pour 5 cm<sup>3</sup> du milieu, était de 4 cm<sup>3</sup> 4 avant l'ensemencement, avait passé, après cinq jours, à 7 cm<sup>3</sup> 55. La présence de substance réductrice dans ce milieu était accusée par la déviation lévogyre de — 5' pour un tube de 20 cm. et par le pouvoir cuproréducteur qui correspondait à 0,39 de Cu pour 100 cm<sup>3</sup> de liquide.

3° VARIATIONS DU *pH* ET DE L'ACIDITÉ A LA PHTALÉINE. — Les variations de l'acidité et du *pH* ont été assez différentes, suivant la nature du sel ammoniacal contenu dans les milieux. Avec le sulfate d'ammonium, le taux de l'acidité s'élève progressivement, en même temps que le *pH* diminue dans des proportions sensiblement identiques. Comme l'ont signalé divers auteurs, cette acidité semble être la conséquence d'une consommation par le bacille d'une quantité d'ammoniaque qui est supérieure à la quantité d'acide sulfurique utilisée. Toutefois, si l'augmentation de l'acidité va de pair avec la diminution de l'ammoniaque, elle ne lui correspond pas rigoureusement molécule à molécule; il suffit de consulter les lignes horizontales des tableaux I et II où ont été consignées les variations de l'acidité et de l'ammoniaque en millimolécules pour voir que pendant

les dix premiers jours la consommation de l'ammoniaque et de l'acidité progressent en présentant les écarts suivants :

Premier tableau : 6 et 3 pour l'acidité; 6,7 et 3,6 pour l'ammoniaque;

Deuxième tableau : 2, 2 et 2 pour l'acidité; 2,6, 2,0 et 2,1 pour l'ammoniaque.

Avec le citrate d'ammonium (tableau III) on constate que les variations du  $pH$  et de l'acidité à la phtaléine présentent à plusieurs stades des divergences inexplicables. C'est ainsi que le  $pH$  diminue d'une manière régulière pendant toute la période de croissance active, c'est-à-dire du 19 au 25 mai, ce qui concorde avec les résultats des tableaux I et II, puis le  $pH$  s'élève pour atteindre en deux jours (27 mai) presque la neutralité. Quant à l'acidité à la phtaléine, elle augmente pendant les deux premiers jours de croît modéré pour diminuer notablement pendant les quatre jours suivants où le croît est intense et accompagné d'une consommation considérable d'ammoniaque. Enfin, pendant la dernière période où la croissance paraît se ralentir et alors que la teneur en ammoniaque reste sensiblement identique, le  $pH$  et l'acidité à la phtaléine redevennent concordants, puisque celle-ci décroît en même temps que le  $pH$  tend à atteindre la neutralité.

Ces faits, qui s'expliquent en partie par la faible ionisation de l'acide citrique libéré et par les grandes quantités d'ammoniaque consommée, méritent d'être repris afin de chercher à en expliquer la cause en se basant sur de nouvelles expériences.

---

## CONCLUSIONS

---

1° J'ai isolé une bactériacée qui dans les milieux de culture contenant de la glycérine transforme celle-ci en aldéhyde l-glycérique qu'on peut séparer à l'état de pureté par entraînement à la vapeur d'eau.

2° Cet aldéhyde glycérique qui a été identifié par sa phénylosazone et par sa transformation en méthylglyoxal présente les caractères spécifiques suivants : réduction à froid de la liqueur de Fehling, recoloration du réactif de Schiff, pouvoir rotatoire lévogyre.

3° L'étude des variations de quelques-uns des constituants des milieux de culture de cette bactériacée productrice d'aldéhyde glycérique a permis d'établir que d'une façon générale cette formation d'aldéhyde glycérique, qui commence deux ou trois jours après l'ensemencement, va en croissant pendant une ou deux semaines; en même temps, le  $\mu\text{H}$  s'abaisse, le taux de l'acidité s'élève et la consommation d'ammoniaque augmente. Puis la formation d'aldéhyde glycérique semble s'arrêter; simultanément le  $\mu\text{H}$  tend à s'élever, l'acidité diminue ou ne progresse plus que lentement, et l'ammoniaque du milieu, consommée en moindre quantité et probablement libérée des produits azotés de synthèse, augmente dans les milieux.

Vu : *Le Président de la Thèse,*

A. DESGREZ.

Vu : *Le Doyen,*

BALTHAZARD.

Vu et permis d'imprimer :

*Le Recteur de l'Académie de Paris,*

S. CHARLÉTY.



## BIBLIOGRAPHIE

---

1. BACH : Contribution à l'étude de la nutrition azotée de l'*Aspergillus repens* de BARY. Influence de la réaction du milieu. *Thèse Faculté des Sciences*, Paris, 1925, BRULLIARD, Saint-Dizier.
2. BASS et JOHNSON : Some chemical changes accompanying the growth of Timothy bacilli on Long's synthetic medium. *Amer. Rev. Tuber.*, 1929, 20, p. 122.
3. BERTHELOT (A.) : Recherches sur quelques caractères spécifiques du *Proteus vulgaris*. *C. R. Soc. Biol.*, 1913, 71, p. 575. *Thèse Faculté de Médecine*, Paris, 1913.
4. BERTRAND (Gabriel) : Sur le produit d'oxydation de la glycérine par la bactérie du sorbose. *C. R. Ac. Sc.*, 1928, 126, p. 842. Etude biochimique de la bactérie du sorbose. *Ann. Ch. Ph.*, 1904, 3, p. 246-258.
5. BERTRAND (Gabriel) : Préparation biochimique de la dioxyacétone cristallisée. *C. R. Ac. Sc.*, 1898, 126, p. 984.
6. BERTRAND (Gabriel) et SAZERAC : Sur une différenciation biochimique des deux principaux ferments du vinaigre. *C. R. Ac. Sc.*, 1901, 132, p. 1504.
7. BORDAS, JOULIN et RACKOWSKI : Sur les microorganismes des vins dits « tournés ». *C. R. Ac. Sc.*, 1898, 126, p. 1050.
8. CHALLENGER, KLEIN et WALKER : The formation of kojic Acid from sugars by *Aspergillus oryzae*. *J. Chem. Soc.*, Lond., 1931, p. 16.
9. DAVID (R.) : Contribution à l'étude numérique de la multiplication du bacille pyocyanique dans différents milieux de culture liquides. Influence de la teneur des milieux en certains éléments nutritifs. *Thèse Faculté Sciences*, Paris, 1931, DURAND, Chartres.
10. FENTON et JACKSON : The oxydation of polyhydric alcohols in presence of iron. *J. Chem. Soc. Lond.*, 1899, 75, p. 1. WITZEMANN, *Jl Amer. Chem. Soc.*, 1914, 36, p. 2223.
11. FERNBACH : Sur la dégradation biologique des hydrates de carbone, *C. R. Ac. Sc.* 1910, 151, p. 1.004.

12. JOHNSON et RENFREW : Some chemical changes accompanying the growth of tubercle bacilli on Long's synthetic medium. *Amer. Rev. Tub.*, 1928, **17**, p. 508.
  13. JOHNSON et RENFREW : Carbohydrates in biological processes. *Amer. Rev. Tub.*, 1930, **22**, p. 655.
  14. LONG et MAJOR : A method of following reaction changes in cultures of acidfast bacteria. *Amer. Rev. Tub.*, 1921, **5**, p. 715.
  15. NEUBERG : Ueber Farbenreaktionen der Triosen und des Methylglyoxals. *Biochem. Zeitschr.*, 1915, **74**, p. 150.
  16. NEUBERG, FAERBER, LEVITE et SCHWENK : Ueber die Hexosediphosphorsäure, ihre Zusammensetzung und die Frage ihrer Rolle bei der alkoholischen Gärung, sowie über das Verhalten der Dreikohlenstoffzucker zu Hefen. *Biochem. Zeitschr.*, 1917, **83**, p. 244.
  17. PÉRÉ : Mécanisme de la combustion des corps ternaires par un groupe de microbes aérobies. *Ann. Inst. Pasteur*, 1896, **10**, p. 417.
  18. RENFREW, BASS et JOHNSON : Some chemical changes accompanying the growth of avian tubercle bacilli on Long's synthetic medium. *Amer. Rev. Tub.*, 1929, **20**, p. 114.
  19. RENFREW, HARING et JOHNSON : Some chemical changes accompanying the growth of bovine tubercle bacilli on Long's synthetic medium. *Amer. Rev. Tub.*, 1930, **22**, p. 116.
  20. VALLE MIRANDA (F.-G.) : Recherches biochimiques sur deux races de *Proteus vulgaris* Hauser. *Thèse Faculté des Sciences*, Paris, 1917, Gauthier-Villars.
  21. WOHL : Ueber die Acetale des Acroleins und des Glycerinaldehydes. *Ber. d. chem. Ges.*, 1898, **31**, p. 1800.
-



